

CE

LH-ELISA

KAPD1289

DIAsource ImmunoAssays S.A. - Rue du Bosquet, 2 - B-1348 Louvain-la-Neuve - Belgium


LOT : 140127/1



LH ELISA

en

KAPD1289

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DIAsource LH ELISA Kit** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of the Luteinizing Hormone (LH) in serum.

1.2 Summary and Explanation

Luteinizing hormone (LH) is produced in both men and women from the anterior pituitary gland in response to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH or Gn-RH), which is released by the hypothalamus (1-3). LH, also called interstitial cell-stimulating hormone (ICSH) in men, is a glycoprotein with a molecular weight of approximately 30.000 daltons (4). It is composed of two non covalently associated dissimilar amino acid chains, alpha and beta (5). The alpha chain is similar to that found in human thyroid-stimulating hormone (TSH), follicle stimulating hormone (FSH), and human chorionic gonadotropin (hCG). The difference between these hormones lie in the amino acid composition of their beta subunits, which account for their immunological differentiation (6-8).
The basal secretion of LH in men is episodic and has the primary function of stimulating the interstitial cells (Leydig cells) to produce testosterone. The variation in LH concentrations in women is subject to the complex ovulatory cycle of healthy menstruating women, and depends upon a sequence of hormonal events along the gonado-hypothalamic-pituitary axis. The decrease in progesterone and estradiol levels from the preceeding ovulation initiates each menstrual cycle (9,10). As a result of the decrease in hormone levels, the hypothalamus increases the secretion of gonadotropin-releasing factors (GnRF), which in turn stimulates the pituitary to increase FSH production and secretion (4). The rising FSH levels stimulate several follicles during the follicular phase, one of these will mature to contain the egg. As the follicle develops, estradiol is secreted, slowly at first, but by day 12 or 13 of a normal cycle increasing rapidly. LH is released as a result of this rapid estradiol rise because of direct stimulation of the pituitary and increasing GnRF and FSH levels. These events constitute the pre-ovulatory phase (11).
Ovulation occurs approximately 12 to 18 hours after the LH reaches a maximum level. After the egg is released, corpus luteum is formed which secretes progesterone and estrogen - two feedback regulators of LH (3,10).
The luteal phase rapidly follows this ovulatory phase, and is characterized by high progesterone levels, a second estradiol increase, and low LH and FSH levels (12). Low LH and FSH levels are the result of the negative feedback effects of estradiol and progesterone on the hypotalamic-pituitary axis.
After conception, the developing embryo produces hCG, which causes the corpus luteum to continue producing progesterone and estradiol. The corpus luteum regresses if pregnancy does not occur, and the corresponding drop in progesterone and estradiol levels results in menstruation. The hypothalamus initiates the menstrual cycle again as a result of these low hormone levels (12).
Patients suffering from hypogonadism show increased concentrations of serum LH. A decrease in steroid hormone production in females is a result of immature ovaries, primary ovarian failure, polycystic ovary disease, or menopause; in these cases, LH secretion is not regulated (10,13). A similar loss of regulatory hormones occurs in males when the testes develop abnormally or anorchia exists. High concentrations of LH may also be found in primary testicular failure and Klinefelter syndrome, although LH levels will not necessarily be elevated if the secretion of androgens continues. Increased concentrations of LH are also present during renal failure, cirrhosis, hyperthyroidism, and severe starvation (10,14).
A lack of secretion by the anterior pituitary may cause lower LH levels. As may be expected, low levels may result in infertility in both males and females. Low levels of LH may also be due to the decreased secretion of GnRH by the hypothalamus, although the same effect may be seen by a failure of the anterior pituitary to respond to GnRH stimulation. Low LH values may therefore indicate some dysfunction of the pituitary or hypothalamus, but the actual source of the problem must be confirmed by other tests (10).
In the differential diagnosis of hypothalamic, pituitary, or gonadal dysfunction, assays of LH concentration are routinely performed in conjunction with FSH assays since their roles are closely interrelated. Furthermore, the hormone levels are used to determine menopause, pinpoint ovulation, and monitor endocrine therapy.

2 PRINCIPLE OF TEST

The DIAsource LH ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle.
The microtiter wells are coated with a monoclonal [mouse] antibody directed towards a unique antigenic site on a LH molecule. An aliquot of patient sample containing endogenous LH is incubated in the coated well with enzyme conjugate, which is an anti-LH monoclonal antibody conjugated with horseradish peroxidase. After incubation the unbound conjugate is washed off.
The amount of bound peroxidase is proportional to the concentration of LH in the sample.
Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the concentration of LH in the patient sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.

6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21-26°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H_2SO_4. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DIAsource.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells,** 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells.
   Wells coated with anti-LH monoclonal antibody.

2. | CAL | N | **LH Calibrators**. N= 0 to 5, 6 vials (lyophilized), 1 mL
   Concentration : 0; 10; 20; 40; 100 ; 200 mIU/mL
   The calibrators are calibrated against WHO 2nd International Calibrator for LH IRP (80/552)
   See "Preparation of Reagents"
   Contain 0.03% Proclin 300, 0.015% BND and 0.010% MIT as preservative.

3. | Ab | HRP | **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 11 mL. Ready for use.
   Anti-LH antibody conjugated to horseradish peroxidase.
   Contains 0.03 % Proclin 300, 0.015 % BND and 0.010 % Mit as preservative.

4. | CHROM | TMB | **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL. Ready for use.
   Tetramethylbenzidine (TMB)

5. | STOP | SOLN | **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL. Ready for use.
   Contains 0.5 M H_2SO_4.
   Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

   BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
   MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

Note: Additional *Calibrator 0* for sample dilution is available on request.

4.2 Material required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.
Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.
Opened kits retain activity for six weeks if stored as described above.

4.4 Reagents Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Calibrators

Reconstitute the lyophilized contents of the calibrator vial with 1 mL Aqua dest.

Note: *The reconstituted calibrators are stable for 2 months at 2 °C to 8 °C. For longer storage freeze at –20 °C.*

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheets.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DIAsource has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Only serum should be used in this assay.
Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.
Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 48 hours at 2 °C to 8 °C prior to assaying.
Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest calibrator, the specimens can be diluted with *Calibrator 0* and reassayed as described in Assay Procedure.
For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.
Example:
a) dilution 1:10: 10 µL Serum + 90 µL *Calibrator 0* (mix thoroughly)
b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Calibrator 0* (mix thoroughly).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

1. All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
2. Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
3. Use new disposal plastic pipette tips for each calibrator, control or sample in order to avoid cross contamination
4. Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
5. As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
6. Pipetting of all calibrators, samples, and controls should be completed within 6 minutes. (note this especially for manual pipetting.)

6.2 Test Procedure

Each run must include a calibration curve.

1. Secure the desired number of Microtiterwells in the holder.
2. Dispense **25 µL** of each *Calibrator, controls* and samples with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL** *Enzyme Conjugate* into each well.
   Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **30 minutes** at room temperature.

5. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **5 times** with aqua dest (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
   Important note:
   The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Add **100 µL** of *Substrate Solution* to each well.
7. Incubate for **10 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µL** of *Stop Solution* to each well.
9. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.
   It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a calibration curve by plotting the mean absorbance obtained from each calibrator against its concentration with absorbance value on the vertical(y) axis and concentration on the horizontal (x) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: the results in the ifu have been calculated automatically using a 4 pl (4 parameter logistics) curve fit. 4 parameter logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this calibration curve. Samples with concentrations higher than that of the highest calibrator have to be further diluted or reported as > 200 miu/ml. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Calibration Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Calibrator	Optical Units (450 nm)
Calibrator 0 (0 mIU/mL)	0.04
Calibrator 1 (10 mIU/mL)	0.12
Calibrator 2 (20 mIU/mL)	0.26
Calibrator 3 (40 mIU/mL)	0.49
Calibrator 4 (100 mIU/mL)	1.22
Calibrator 5 (200 mIU/mL)	1.82

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DIAsource LH ELISA the following values are observed:

Population		LH (mIU/mL)
Adult Female	Follicular and luteal phase	≤ 20
	LH Surge	20 – 200
Female, post-menopausal		20 – 100
Males		3 – 12

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.
It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.
The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.
It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.
Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.
In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.
After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DIAsource directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 1.27 – 200 mIU/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Hormone Tested	Concentration	Produced Color Intensity Equivalent to LH in Serum (mIU/mL)
hCG (WHO 1st IRP 75/537)	200 mIU/mL	5.2
TSH (WHO 2nd IRP 80/558)	62 µIU/mL	3.0
FSH (WHO 1st IRP 68/40)	200 mIU/mL	2.5

NOTE:
Pregnancy results in elevated levels of hCG, the use of the LH enzyme immunoassay test is not recommended during pregnancy or immediately post-partum.

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DIAsource ELISA was calculated by adding 2 standard deviations to the mean of 20 replicate analyses of the Zero Calibrator (S0) and was found to be 1.27 mIU/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	1	2	3
Mean (mIU/mL)	2.71	15.72	28.33
SD (mIU/mL)	0.21	0.71	1.29
CV (%)	7.62	4.54	4.57
n =	10	10	10

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	1	2	3
Mean (mIU/mL)	2.33	15.36	28.96
SD (mIU/mL)	0.26	0.50	1.29
CV (%)	11.02	3.22	4.45
n =	10	10	10

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding LH solutions with known concentrations in a 1:1 ratio.
The % Recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100.

Sample	Endogenous LH (mIU/mL)	Added LH (mIU/mL)	Measured Conc. LH (mIU/mL)	Expected * LH (mIU/mL)	Recovery (%)
1	7.7	0	7.7		
		100	98.2	103.9	94.5
		50	55.9	53.9	103.8
		20	25.6	23.9	107.4
		10	12.9	13.9	93.0
2	23.6	0	23.6		
		100	101.7	111.8	90.9
		50	59.9	61.8	96.9
		20	31.0	31.8	97.5
		10	19.8	21.8	90.7
3	52.7	0	52.7		
		100	114.2	126.3	90.4
		50	70.9	76.3	92.8
		20	42.8	46.3	92.2
		10	32.6	36.3	89.7

(* Endogenous LH / 2 + added LH because of a 1:1 dilution of serum with spike material.)

9.6 Linearity

Sample	Dilution	Measured Conc. (mIU/mL)	Expected Conc. (mIU/mL)	Recovery (%)
1	None	15.6	15.6	
	1:2	7.6	7.8	97.1
	1:4	3.7	3.9	95.7
	1:8	2.0	2.0	101.5
	1:16	0.9	1.0	88.0
2	None	23.6	23.6	
	1:2	11.4	11.8	96.6
	1:4	5.5	5.9	94.0
	1:8	2.6	3.0	89.7
	1:16	1.3	1.5	89.1
3	None	52.7	52.7	
	1:2	25.9	26.3	98.5
	1:4	12.8	13.2	96.9
	1:8	6.8	6.6	103.3
	1:16	3.5	3.3	105.5

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of LH in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test up to 10,000 mIU/mL of LH.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national calibrators and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.
The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DIAsource.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.
Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.
The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.
Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES

1. Harris, G.W. and Naftolinf., The Hypothalamus and Control of Ovulation,
   Brit. Med. Bullet., 26, 1-9 (1970).
2. Knobil, E., The Neuroendocrine Control of the Menstrual Cycle,
   Rec. Prog. Horm Res., 36, 52-88 (1980).
3. Jeffcoate, S.L., Clinics in Endocrinol. Metab., 4, 521-543 (1975).
4. Whitely, R.J., Keutmann, H.T. and Ryan, R.J., Endocrinology, 102, 1874 (1978).
5. Pierce, J.G. and Parsons, T.F., Glycoprotein hormones: Structure and Function,
   Annual Rev. Biochem., 50, 465-495 (1981).
6. Bardin , C.W. and Paulsen, C.A., "The Testes" in Textbook of Endocrinology, (ed.) R.H. Williams M.D., W.B. Saunders Co., (1981).
7. Shome, B. and Parlow, A.F., J. Clin. Endocrinol. Metabl., 39, 199-202 (1974).
8. Shome, B. and Parlow, A.F., J. Clin. Endocrinol. Metabl., 39, 203-205 (1974).
9. Ross, G.T., VandeWeile, R.L., and Frantz, A.G. Chapter 7 in "The Ovaries and the Breasts" in "Textbook of Endocrinology" (R. H. Williams, Ed.), W.B. Saunders Co. (1981).
10. Marshall, J.C., Clinics in Endocrinal Metab., 4, 545-567 (1975).
11. Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L., Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
12. Brown, J. Wood (eds.), Churchill Livingston Co., New York, 7-42 (1980).
13. Yen, S.S.C., Vela, P. and Rankin, J., J. Clin. Endocrinol. Metab., 30, 434-442 (1970).
14. Cohen, K. L., Metabolism, 26, 1165-1177 (1977).
15. Engvall, E., Methods in Endocrinology, Volume 70, Van Vunakis, H. and Langone, J.J. (eds.),
    Academic Press, New York, 419-492 (1980).
16. Uotila, M. Ruoslahti,E. and Engvall, E., J. Immunol. Methods, 42, 11-15 (1981).

Revision date : 2014-01-27

LH ELISA

CE es

KAPD1289

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático DIAsource. LH ELISA** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del Hormona Luteinizante (LH) en suero.
Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DIAsource LH ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio del sándwich. Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal/policlonal dirigido contra un único foci antigénico en una molécula de Hormona Luteinizante. Se incuba una alícuota de una muestra perteneciente a un paciente que contiene Hormona Luteinizante endógena en los pocillos recubiertos con el enzima conjugado, que es un anticuerpo anti-Hormona Luteinizante conjugado con la peroxidasa endógena. Después de la incubación se lava el conjugado que no se ha unido.
La cantidad de peroxidasa unida es proporcional a la concentración de Hormona Luteinizante en la muestra.
Cuando se añade la solución del sustrato de la peroxidasa, la intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de Hormona Luteinizante en la muestra del paciente.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H_2SO_4 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DIAsource ImmunoAssays S.A. Las hojas de los datos de seguridad se ajustan a las demandas de las guía europea: EU-Guideline 91/155 EC.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. [MTP symbol] ***Microtiterwells*** (Placas multipocillo), 12x8 tiras separables, 96 pocillos;
Pocillos recubiertos con anticuerpo anti- Hormona Luteinizante (monoclonal).

2. CAL | N ***Calibrador (Calibrador 0-5)***, 6 viales (liofilizados), 1 mL;
Concentraciones: 0; 10; 20; 40; 100; 200 mIU/mL.
Los calibradores están calibrados según *WHO 2nd International Calibrador parar* LH *IRP (80/552)*
Ver "Preparación de los Reactivos";
* Contiene 0,03% Proclin 300, 0,015% BND y 0,010% MIT como conservante.

3. Ab | HRP ***Enzyme Conjugate*** (Conjugado enzimático), 1 vial, 11 mL, listo para usar,
Anticuerpo anti- Hormona Luteinizante conjugado con la Peroxidasa de rábano;
* Contiene 0,03% Proclin 300, 0,015% BND y 0,010% MIT como conservante.

4. CHROM | TMB ***Substrate Solution*** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar,
Tetrametilbencidina (TMB).

5. STOP | SOLN ***Stop Solution*** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar,
contiene 0.5M H_2SO_4,
Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en al piel.

* BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane (Bromonitrodioxano)
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (Metilisotiazolona)

Nota: Se puede solicitar el *Calibrador 0* para la dilución de la muestra.

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450±10 nm) (ej. Microtiter Plate Reader).
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.
Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.
Los kits abiertos conservan su actividad durante 6 semanas si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.
Calibradores
Reconstituir los contenidos liofilizados de los viales de los calibradores con 1 mL de agua destilada.
Nota: *Los calibradores reconstituidos son estables durante 2 meses a 2 °C - 8 °C. Para períodos más largos congelar a -20ºC.*

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto.

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DIAsource ImmunoAssays S.A., no mas tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 MUESTRAS

En este ensayo debe usarse sólo suero.
No usar muestras hemolíticas, ictéricas o lipémicas.
Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Toma de muestras

Suero:
Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 48 horas a 2 °C - 8 °C antes del ensayo.
Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el calibrador mas concentrado, ha de diluirse con *Calibrador 0* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.
Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.
Ejemplo:
a) dilución 1:10: 10 µL Suero + 90 µL *Calibrador 0* (mezclar totalmente)
b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Calibrador 0* (mezclar totalmente).

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada calibrador, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.
- El pipeteo de todos los calibradores, muestras y controles debe estar completado en 6 minutos. (Tenerlo en cuenta especialmente para el pipeteo manual).

6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de calibradores.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **25 µL** de cada *Calibrador, Control* y muestras con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µL** de *Enzyme Conjugate* a cada pocillo.
   Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **30 minutes** a temperatura ambiente.
5. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
   Lavar los pocillos **5 veces** con agua destilada (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
   Nota importante:
   La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
6. Adicionar **100 µL** de *Substrate Solution* a cada pocillo.
7. Incubar durante **10 minutes** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **50 µL** de *Stop Solution* a cada pocillo.
9. Leer la OD a **450±10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la *Stop Solution*.

1.

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de calibradores, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva calibrador mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada calibrador frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva calibrador.
4. Método automatizado: Los resultados en la IFU se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 PL (4 Parámetros Logísticos). Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestra puede leerse directamente de la curva de calibradores. Las muestras con concentraciones superiores al mayor calibrador han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Calibrador Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Calibrador	Unidades Ópticas (450 nm)
Calibrador 0 (0 mIU/mL)	0.04
Calibrador 1 (10 mIU/mL)	0.12
Calibrador 2 (20 mIU/mL)	0.26
Calibrador 3 (40 mIU/mL)	0.49
Calibrador 4 (100 mIU/mL)	1.22
Calibrador 5 (200 mIU/mL)	1.82

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DIAsource LH ELISA se observaron los siguientes valores:

Población		LH (mIU/mL)
Mujeres	Fase folicular y luteal	≤ 20
	Pico de LH	20 – 200
Mujeres, posmenopausia		20 – 100
Hombres		3 – 12

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control ser recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.
Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.
Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.
Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.
En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.
Después de comprobar los asuntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DIAsource ImmunoAssays S.A. directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 1,27 – 200 mIU/mL.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

NOTA: El embarazo produce niveles elevados de hCG. El uso del inmunoensayo del enzima LH no se recomienda durante el embarazo o inmediatamente tras el parto

9.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media mas dos desviaciones calibrador de veinte (20) réplicas del *Calibrador 0* y resultó ser 1,27 mIU/mL.

9.4 Precisión

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.5 Recuperación

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.6 Linealidad

Consultar el manual de usuario en inglés.

10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0.5 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 30 mg/mL) no influencian los resultados del ensayo.

10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de Hormona Luteinizante en una muestra.

10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo hasta 10,000 mIU/mL de Hormona Luteinizante.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros calibradores y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.
Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En cado de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DIAsource ImmunoAssays S.A.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.
Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.
Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad

Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidad cualquier reclamación de reposición.
Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFIA

Consultar el manual de usuario en inglés.

Fecha de revisión: 2014-01-27

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
IVD	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoadsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor
TRAY	Incubation trays
PMSF	PMSF solution
	Protect from light
STRIP	Dot Strip
SUB	Substrate
EXTR SOLN CONC	Extraction Buffer Concentrate
CART	Cartridge
SAV HRP	Streptavidin HRP
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Wash buffer

	Símbolos utilisados
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Codigo de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación
DIST	Distribuidor
TRAY	Bandejas de incubación
PMSF	Solución de PMSF
	Proteger de la luz
STRIP	Tries Dot
SUB	Sustrato
EXTR SOLN CONC	Concentrado de tampón de extracción
CART	Cartucho
SAV HRP	Estreptavidina HRP
PIPETTE	Pipeta
WASH SOLN	Tampón de lavado